动 物 学 研 究 1994，15（4）：55—60 CN 53-1040 Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

家鸡和原鸡的线粒体 DNA 多态性比较

王 文 兰 宏 刘爱华 施立明
（中国科学院昆明动物研究所细胞与分子进化开放研究实验室 650223）

摘要 本文运用 11 种限制性内切酶分析了家鸡(茶花鸡、尼西鸡、大理漾濞黄鸡)和原鸡共 10 只个体的线粒体 DNA 限制性片段长度多态性(RFLP)，平均每个个体检测到的片段为 40 条左右。但仅发现 3 种变异的限制性格局，即 *Stu* Ⅰ-B，*Eca* Ⅰ-B 和 *Eco* RⅠ-B。其中 *Stu* Ⅰ-B 和 *Sca* Ⅰ-B 为首次报道，而且均为原鸡所特有，*Eco* RⅠ-B 则为大理漾濞黄鸡所特有。茶花鸡和尼西鸡拥有完全相同的限制性格局。经过计算，原鸡与茶花-尼西鸡的遗传距离为 0.32%，与漾濞黄鸡的遗传距离为 0.48%。上述结果提示，受试原鸡所代表的云南孟连亚群体可能是一个较为特殊的群体，应受到保护和注意。

关键词 家鸡，原鸡，线粒体 DNA，多态性，遗传分化

鸡是人类驯化较早的家禽，我国又是最早驯化养鸡的国家之一。自 7000 年前我国养鸡以来，鸡一直在我国人民生活中起着重要作用(West 等，1989；陈育新，1993)。在长期的生产实践中，我国人民选育出了众多适应于不同生境条件和饲养条件的家鸡(*Gallus gallus domesticus*)品种。而云南则由于拥有复杂的地理气候条件和众多相对隔离的民族或人群，家鸡品种更是丰富多样。同时，云南还分布着家鸡的近缘祖先——红色原鸡(*Gallus gallus*，简称原鸡)(黄启昆等，1987；陈育新，1993)。这些品种是我国家禽中的宝贵遗产，是进行品种选育的难得材料。但是随着外来品种的大量引入和繁育，云南许多本地鸡品种的遗传特质也随着群体数量锐减和品种间杂交而迅速消亡。我们有必要采用一些现代遗传学方法分析鸡品种内的遗传背景和品种间的遗传分化，从而为品种的保存和保护以及品种的选育提供基础资料。

80 年代以来，线粒体 DNA(mtDNA)由于具有进化速度快，母系遗传和分子简单易于分析等特点而成为研究近缘种间和种内群体间遗传分化关系的有力工具(Harrison，1989)。国外已有人用 mtDNA 的限制性片段多态性(RFLP)技术探讨了一些欧洲和日本家鸡品种的 mtDNA 变异，发现这些家鸡的 mtDNA 变异程度很低，可能有着较为晚近和单一的起源(Hecht，1990；Glaus 等，1980；Wakana 等，1986)。本文旨在应用 mtDNA RFLP 技术分析云南茶花鸡、尼西鸡、大理漾濞黄鸡以及原鸡的 mtDNA 多态性，据此评估家鸡和原鸡的遗传多样性，探讨品种的起源和品种间的遗传分化关系。

本文 1993 年 11 月 1 日收到，1994 年 1 月 6 日修回

1 材料和方法

1.1 材料来源

详见表1

表1 材料来源

Tab. 1 Material resources

品种	个体数	采集地	采集年代
茶花鸡	3	西双版纳州兽医站	1991
尼西鸡	1，2	迪庆州尼西乡	1991、1993
大理漾濞黄鸡	3	大理州漾濞县	1991
原鸡	1	思茅地区孟连县	1991

1.2 mtDNA的提取和检测

mtDNA的制备按照本实验室改进的碱变性法(王文等，1993)进行。自肝提取的mtDNA样品用 *Ava* Ⅰ、*Bam* HⅠ、*Bgl* Ⅰ、*Dra* Ⅰ、*Eco* RⅠ、*Hpa* Ⅰ、*Pvu* Ⅱ、*Sac* Ⅰ、*Sal* Ⅰ、*Sca* Ⅰ和 *Stu* Ⅰ共11种限制性内切酶酶解。酶解反应按厂商推荐的条件进行。样品酶解后以0.8%琼脂糖凝胶(含0.5 μg／ml 溴化乙锭)电泳分离。电极缓冲液为Tris-硼酸(pH8.3)系统，电压3V／cm，时间8—10 h。254 nm紫外光照射下观察拍照。

1.3 数据处理和分析方法

以λDNA／*Hind* Ⅲ作为分子量标记，确定样品mtDNA酶解后每一片段的分子量。运用片段法(Nei等，1979)，两两配对算出限制性类型间的片段共享度 F：

$$F=2N_{xy}/(N_x+N_y)$$

其中，N_{xy} 是 X、Y 两类型间共有的酶切片段数，N_x 是 X 类型的片段总数，N_y 是 Y 类型的片段总数。再利用 F 得出两个类型间的遗传距离 P：

$$P=1-[-F+(F^2+8F)^{1/2}/2]^{1/r}$$

r 为限制性内切酶识别序列的碱基数。

2 结果与讨论

2.1 限制性格局(restriction pattern)

mtDNA经某种限制性内切酶消化后获得的电泳条带称为限制性片段(restriction fragment)，这些片段的组合形式即是限制性格局。在所用11种限制性内切酶中，仅 *Stu* Ⅰ、*Sca* Ⅰ和 *Eco* RⅠ3种酶出现变异，图1为这3种酶的限制性片段的电泳结果，1—2、3—4和5—6分别对应于 *Stu* Ⅰ，*Eco* RⅠ和 *Sca* Ⅰ的两种限制性格局。

经过计算，3种家鸡和原鸡的mtDNA分子大小均约为16.5 kb，与文献报道相符(Glaus等，1980；Wakana等，1986)。表2列示了每种酶的限制性片段的大小和各种限制性格局。本研究中共获得43个片段。可以看到，限制性格局 *Stu* Ⅰ-B和 *Sca* Ⅰ-B为原鸡所特有，*Eco* RⅠ-B则为3只漾濞黄鸡所特有。*Stu* Ⅰ失去1.0 kb与0.1 kb之间的酶切点就得到 *Stu* Ⅰ-A型；*Sca* Ⅰ-B型的14.0 kb片段获得一个酶切点就变成 *Sca* Ⅰ-B型；漾濞黄鸡的 *Eco* RⅠ-B型则比其它鸡多了一个酶切点。

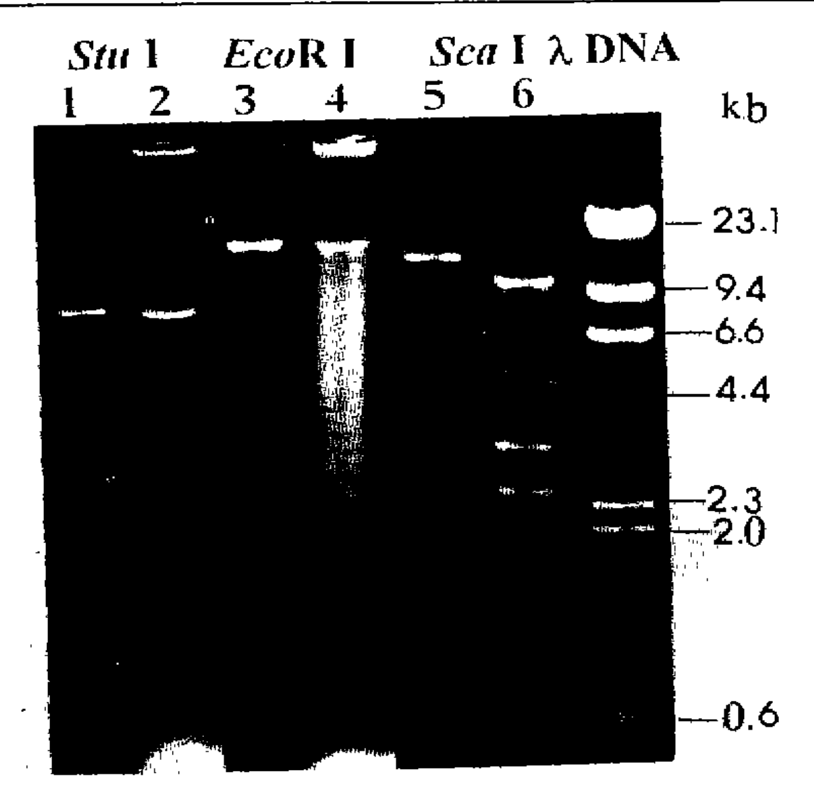


图 1　*Stu* Ⅰ、*Eco* RⅠ和 *Sca* Ⅰ的限制性片段电泳结果，示原鸡(1、5)和大理漾濞黄鸡(4)的变异

Fig. 1　Electrophoretic patterns of chicken mtDNA digested by *Stu* Ⅰ、*Eco* R Ⅰ and *Sca* Ⅰ, showing the variation of the mtDNA of red fungle fowl and Dali yangbi yellow breed

表 2　限制性片段和限制性格局

Tab. 2　Restriction fragments and restriction pattern

酶	限制性格局	代表品种	限制性片段大小(kb)
Ava Ⅰ	A		5.8，3.9，3.5，2.1，1.2
Bam HⅠ	A		12.2，4.3
Bgl Ⅰ	A		11.5，2.6，1.6，0.8
Dra Ⅰ	A		7.7，4.0，2.5，2.3
Eco RⅠ	A	茶花鸡、尼西鸡、原鸡	16.5
	B	漾濞黄鸡	15.2，1.3
Hpa Ⅰ	A		11.6，3.5，1.4
Pvu Ⅱ	A		10.4，2.5，2.2，1.4
Sac Ⅰ	A		10.2，4.4，2.0
Sal Ⅰ	A		6.6，5.1，4.8
Sca Ⅰ	A	家鸡	10.6，3.4，2.5
	B	原鸡	14.0，2.5
Stu Ⅰ	A	家鸡	7.9，1.9，1.5，1.3，1.2，1.1，0.6，0.5，0.4
	B	原鸡	7.9，1.9，1.5，1.3，1.2，1.0，0.6，0.5，0.4，(0.1)**

* 未特别注明者表示在所有鸡中均一致　** 不能在琼脂糖胶上检测到

Stu Ⅰ-B 和 *Sca* Ⅰ-B 为首次报道。Wakana 等(1986)的工作中曾包含了 1 只捕自非

律宾的原鸡，他们也采用了 *Stu* Ⅰ这个酶，但发现原鸡与其它鸡均为 *Stu* Ⅰ-A 型。*Scu* Ⅰ为我们第1次将之用于鸡的 mtDNA 分析，它也能将受试的原鸡与其它家鸡分开。由于同时检测到两个变异，不大可能是该原鸡偶然突变的结果，提示我们采集到的这只原鸡可能代表了一个较为特殊的群体，与家鸡已有一定程度的遗传分化。

本研究发现所有的3只大理漾濞黄鸡均具有不同于其它鸡的 *Eco* RⅠ-B 限制性格局。经查证，大理漾濞黄鸡是江苏溧阳的九斤黄品种与漾濞本地鸡杂交后选育出的品种（许文博，个人交流）。由于 *Eco* RⅠ-B 型不存在于茶花鸡和尼西鸡这两种典型的云南地方品种中，大理漾濞黄鸡的母本或许是九斤黄而非漾濞本地鸡。当然，我们也不能排除这是偶然突变的结果。看来，有必要检测九斤黄的 mtDNA 证实这种可能性。

表3 RFLP 单倍型间的遗传距离(%)

Tab. 3 Genetic distance among haplotypes(%)

	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ
Ⅰ	41	39	38
Ⅱ	0.26	42	37
Ⅲ	0.32	0.48	41

注：对角线以上为共享片段数，对角线上为单倍型自身拥有的片段数；对角线以下为遗传距离

应当指出，尽管3种家鸡品种的生境和表型性状差异较大(黄启昆等，1987)，但除 *Eco* RⅠ在大理漾濞黄鸡检出变异外，所有内切酶在家鸡中均获得相同的限制性格局。这种变异较小的倾向与 Wakana 等(1986)以及 Glaus 等(1980)的研究结果相符，进一步说明家鸡的起源较为单一和晚近。值得指出的是，其它家养动物中也发现了类似的情况(Lan 等，1993)。这种家养动物分化较晚又多型多种可能与人工的强烈选择有关。

2.2 RFLP 单倍型(RFLP haplotype)

RFLP 单倍型是指综合所有限制性内切酶的限制性格局后而得到的一种 mtDNA 分子类型。在我们的研究中共得到Ⅰ、Ⅱ和Ⅲ3种鸡 mtDNA RFLP 单倍型，分别对应于茶花-尼西鸡、大理漾濞黄鸡和原鸡。这三者之间的遗传距离列于表3中。

基于表3我们对3种鸡 mtDNA RFLP 单倍型进行了 UPGMA (Sneath 等，1973)和 NJ(Saito 等，1987)聚类分析。结果如图2。很明显，大理漾濞黄鸡（Ⅱ）与茶花-尼西鸡（Ⅰ）关系最近，其次它们才与原鸡(Ⅲ)聚类。

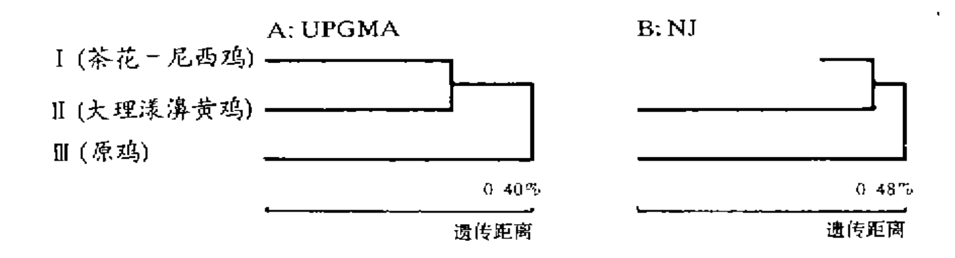


图2 3种 RFLP 单倍型的 UPGMA 和 NJ 聚类关系图

Fig. 2 UPGMA and NJ dendrograms of three RFLP haplotypes

Helm-Bychowski (1984，转引自 Shield 等，1987)曾标定了雉类动物的 mtDNA 进化速度为每百万年 2%的碱基取代率，与哺乳类中一致。鸡是一种雉类动物。如果雉类动物线粒体 DNA 的进化速度都相近，那么本研究中原鸡与茶花-尼西鸡之间的分歧已将近 16 万年、与大理漾濞黄鸡的分歧则已达 24 万年。但人类驯养鸡的历史只有 7000 年(West 等，1989；陈育新，1993)，而人们一般都相信原鸡是家鸡的最近野生祖先(达尔文，1905；Stewens；1991)；曾养志(1987)的核型比较研究也表明家鸡与原鸡拥有相同的核型，Wakana 等人(1986)的工作则更是发现采自菲律宾的原鸡与 15 种家鸡品种都有相同的 mtDNA RFLP 单倍型。本研究中的结果似与这些资料不相同。为解释这一矛盾，我们推测，虽然从各家鸡品种 mtDNA 遗传距离较近这一事实看来现生家鸡品种可能起源自单一的原鸡祖先群体，但人类在用原鸡驯养家鸡时，原鸡种群中可能还存在一些相对隔离的亚群体；那些现在仍在生存却又与家鸡遗传背景有较大不同的原鸡亚群体(如孟连亚群体)可能是值得注意和保护的鸡种质资源库，它们在增加家鸡基因库遗传多样性方面和未来的鸡品种选育中可能有较重要的价值。看来，如果可能的话，应再检测更多的孟连原鸡个体和其它原鸡亚群体的 mtDNA 遗传多样性，以证实上述观点的正确性，更重要的是为有选择地保存更多的鸡种质资源提供基础资料。

致谢　朱静同志参与部分实验材料的收集工作、日本 Saitama 肿瘤研究中心的 O. Gotch 教授提供 UPGMA 和 NJ 聚类分析软件，特此致谢。

参 考 文 献

达尔文，1905. 动物和植物在家养条件下的变异. 方宗熙、叶晓文译，北京：科学出版社，1966.

陈育新，1993. 中国的鸡品种. 大自然，(1)：6—7.

黄启昆，王玉嵩，王守信等，1987 云南省家畜家禽品种志. 昆明：云南科技出版社.

王　文，施立明，1993 一种改进的动物线粒体 DNA 提取方法. 动物学研究，**14**(2)：197—198

曾养志，1987. 家鸡和原鸡的染色体及 G-带带型比较研究 云南农业大学学报，**2**(2)：34—37.

Harrison P G，1989. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Tree*，4：6-11.

Hetch W，1990. Studies on mitochdrial DNA in farm animals　In：Geldermann H and Ellendorff F eds：Genome analysis in domestic animals. New York：VCH Publishers Inc.，259-268.

Lan H，Shi L M，1993. The origin and differentiation of native breeds of pigs in Southwest China：An approach from mitochondrial DNA　*Biochem. Genet*，**31**：51-60

Nei M，Li W H，1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases *Proc Natl. Acad. Sci. USA.*，**76**：5269-5273

Shield G F，Wilson A C，1987. Caliberation of mitochondrial DNA in Geese，*J Mol. Evol.*，**24**：212-217.

Sneath P H A，Sokal R R，1973 Numerical Taxonomy，Freeman，San Francisco.

Saito M，Nei M，1987. The neighbor-joining method：a new method for restructing phylogenetic trees *Mol Biol. Evol.*，**40**：406-425.

Stewens L，1991 Genetics and evolution of the domestic fowl. Cambridge University Press，1-14.

Wakana S, Watanabe T, Tomita T. 1986 A variant in the restriction endonuclease cleavage pattern of mitochondrial DNA in the domestic fowl, *Gallus gallus domesticus*. *Animal Genetics*, **17**: 159-168.

West B, Zhou B X, 1989 Did chicken go north? New evidence for domestication. *World's Poultry Science Journal*, **45**: 205-218

VARIATION OF MITOCHONDRIAL DNA AMONG DOMESTIC FOWLS AND RED JUNGLE FOWL

Wang Wen Lan Hong Liu Aihua Shi Liming

(*Laboratory of Cellular and Molecular Evolution, Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica, Kunming* 650223)

Abstract

Eleven restriction endonucleases were employed to assay the variation of mitochondrial DNA (mtDNA) among 9 domestic fowls (three of each Chahua breed, Nixi breed and Dali yangbi yellow breed) and 1 red jungle fowl. About 40 fragments were scored in each individual averagely. Three mtDNA variants were discovered, namely, *Stu* I-B, *Sca* I-B and *Eco* R I-B. The patterns of *Stu* I-B and *Sca* I-B were reported firstly, and only occurred in the red jungle fowl. *Eco* R I-B was specialized in Dali Yangbi breed. In the other hand, Chahua and Nixi breeds share the identical restriction patterns. Based on the shared fragments, the genetic distances among breeds which have different mtDNA haplotypes were calculated. The distance between the red jungle fowl and Chahua-Nixi is 0.32%, that between the red jungle fowl and Dali Yangbi yellow fowl is 0.48%. These results imply that the red jungle fowl experimented may be out of a special subpopulation, which deserves more attention as well as protection.

Key words Domestic fowl, Red fungle fowl, Mitochondrial DNA polymorphism, Genetic differentiation